

## 衝撃波による致死肺出血マウスに対する人工血小板 (H12-ADP-liposome) の救命効果

防衛医科大学校生理学講座<sup>1)</sup>、同 免疫微生物学講座<sup>2)</sup>、同 救急部<sup>3)</sup>、同 防衛医学研究センター情報システム研究部門<sup>4)</sup>、日本医科大学形態解析共同研究施設<sup>5)</sup>、早稲田大学先進理工学部<sup>6)</sup>、防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門<sup>7)</sup>

萩沢 康介<sup>1)</sup>、木下 学<sup>2)</sup>、宮脇 博基<sup>3)</sup>、佐藤 俊一<sup>4)</sup>、鈴木 英紀<sup>5)</sup>  
土井 麻美<sup>6)</sup>、武岡 真司<sup>6)</sup>、小野 聡<sup>7)</sup>、斎藤 大蔵<sup>7)</sup>、西田 育弘<sup>1)</sup>

### 要旨

【はじめに】爆発などの衝撃波による外傷では、中空臓器である肺損傷から、致死性の肺出血を合併することが多い。われわれはレーザー誘起衝撃波を用いて、ヒトの Blast Lung Injury の病像に近似した致死性肺出血マウスモデルの作製に成功しており、今回、H12-ADP-liposome 投与が救命効果を発揮するか検討した。【方法】H12-ADP-liposome をマウスの尾静脈から投与した後に、レーザー誘起衝撃波 (8 J) を右側背から照射した (n=13)。生理食塩水投与 (n=12)、分子標的性のない ADP-liposome 投与 (n=10)、PBS-liposome 投与 (n=10) にも同様にレーザー誘起衝撃波を照射して、5日後の生存率を比較した。【結果】H12-ADP-liposome 群が他群に比して有意に生存した。病理学的検討では H12-ADP-liposome 群では生食投与群に比べて非照射側 (左側) 肺での出血面積が縮小していた。また気管支肺胞洗浄液中の TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカイン濃度の上昇が抑制されていた。【結論】H12-ADP-liposome の投与は、衝撃波による致死肺出血の救命に有用である可能性が示唆された。

### 1. 背景

Blast Lung Injury は戦傷者のとくに多発外傷で頻発する。1944年のモンテ・カッシーノの戦闘で外見からは胸部外傷の所見なく死亡した兵士 87名の剖検例の 34.5%で Blast Lung Injury の合併を認めた<sup>1)</sup>。また 1969年から 1974年の北アイルランド紛争の犠牲者の 47%にびまん性肺挫傷を認めている<sup>2)</sup>。そもそも肺は鼓膜に次いで爆発・衝撃波による損傷を蒙りやすい臓器である。それは衝撃圧が肺胞と毛細血管の境界を通過する際に、肺胞壁の破断を生じ、出血、肺挫傷さらには気胸・血胸・皮下気腫などを引き起こすためである。戦闘用の防弾服は、弾丸そのものや爆発物の破片による 2次的な被害から体幹を防護する効果はあるものの、1次的な Blast Injury すなわち衝撃圧損傷に対しては無力である<sup>3)</sup>。

現在に至るまで Blast Lung Injury に対しての特異的な治療法は確立していない。治療ガイドラインは頸椎保護、気道確保、酸素供給、呼吸管理、出血の制御と循環管理を推奨しているに過ぎない<sup>4)</sup>。

Blast Lung Injury の病態生理は、いくつかの急性肺傷害の病態が複合している。肺胞壁の機械的過進展という点では、人工呼吸による肺損傷 (VILI) に類似している。また低酸素症/低血圧の遷延に関しては、虚血再灌流傷害モデルに類似している。これらに共通するのは肺胞への出血と滲出液・炎症細胞の浸潤である。その病態制御に、内因性アデノシン産生とアデノシン受容体活性が重要であることがわかってきた。

われわれは人工血小板として H12-ADP-liposome (平均径 210 nm) を開発してきた。これは血小板が凝集するために不可欠な血小板膜糖タンパクの IIb/IIIa 複合体をターゲットに、フィブリノゲン  $\gamma$  鎖カルボキシル末端にある 12 個のペプチド (HHLGGAKQAGDV 配列: H12) をリポソーム膜の表面に組み込むとともに、リポソーム内部にアデノシン 5'-二リン酸 (ADP) を含有させている<sup>5)</sup>。H12-

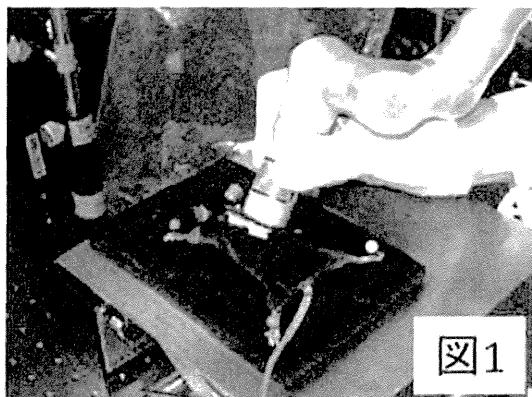


図1 マウスへのレーザー誘起衝撃波 (LISW) 照射

ADP-liposome は出血局所において血小板同士の凝集を補強するとともに内封していた ADP を放出する。H12-ADP-liposome (20 mg/kg) の投与で致死的な低血小板性凝固障害の止血凝固能を回復させ救命が可能になった<sup>6)</sup>。この ADP は、P2Y 受容体を介した血小板凝集促進作用だけではなく、アデノシンに代謝され臓器保護に作用すると考えられることから、H12-ADP-liposome 投与が Blast Lung Injury の新しい治療法につながるものと考えた。本研究はヒトの Blast Lung Injury の病像に近似した致死性のマウス肺出血モデルを用いて、H12-ADP-liposome による Blast Lung Injury の低減・救命効果を検証するとともに、そのメカニズム解明を目的とした。

## 2.方法

防衛医科大学校動物実験倫理委員会による承認を受け、計 144 匹の C57BL/6 マウス (25+2 g) を使用した。

### 1) レーザー誘起衝撃波 (LISW) 装置

波長 694 nm の Q スイッチ・ルビー・レーザーをターゲット (天然ゴム+アクリル板: 直径 12.0 mm・厚さ 0.5 mm) に単発照射し、プラズマ現象から衝撃波を形成した<sup>7)</sup>。

### 2) LISW 強度による Blast Lung Injury の死亡閾値

マウスを剃毛後、腹臥位に固定した (図 1)。レーザー装置をマウス右側背より密着させたうえで LISW を右肺全体に照射し、Blast Lung Injury を作成した。6 J、6.5 J、7 J、7.5 J、8 J、8.5 J (n=3 ずつ)、9 J (n=2) の LISW 照射後、気道閉塞による窒息死を防止する体位をとりながら、60 分間呼吸状態などを観察し、回復後は飼育ケージに戻した。

### 3) H12-ADP-liposome 投与による救命効果

H12-ADP-liposome (n=13)、ADP-liposome (n=10)、PBS-liposome (n=10)、生理食塩水 (n=12) を 120  $\mu$ L 尾静脈から投与した。その後、LISW 8 J を右肺に照射し、気道閉塞による窒息死を防止する体位をとりながら、60 分間呼吸状態などを観察し、回復後は飼育ケージに戻した。

### 4) H12-ADP-liposome 投与による臓器保護のメカニズム解明

LISW 実験の 1 時間前に、A2A 受容体拮抗薬 (ZM241385) 10 mg/kg をマウスに皮下注射した (n=6)。同様に A2B 受容体拮抗薬 (PSB 1115) 10 mg/kg をマウスの腹腔内に注入した (n=6)。その後、H12-ADP-liposome 120  $\mu$ L を尾静脈から投与し、LISW 8 J を右肺に照射した。気道閉塞による窒息死を防止する体位をとりながら、60 分間呼吸状態などを観察し、回復後は飼育ケージに戻した。

衝撃波による致死肺出血マウスに対する人工血小板 (H12-ADP-liposome) の救命効果

5) Sonoclot<sup>®</sup>による血液凝固評価と血算測定

- ①H12-ADP-liposome、ADP-liposome、PBS-liposome、生理食塩水 120  $\mu$ L を尾静脈から投与した (n=2 ずつ)。5 分後に腹部大動脈から採血した。
- ②H12-ADP-liposome (n=6)、ADP-liposome (n=5)、PBS-liposome (n=5)、生理食塩水 (n=6) を 120  $\mu$ L、尾静脈から投与した。5 分後に LISW 8 J を照射してただちに腹部大動脈から採血した。いずれのサンプルも血算測定とともに、Sonoclot<sup>®</sup> (Sienco, CO) を使用し、凝集から凝固開始までの時間を反映する clotting time (CT) と凝固の完成を示す clotting rate (CR) を測定し、止血凝固能を総合的に評価した<sup>6)</sup>。

6) 病理組織学的検討

H12-ADP-liposome、生理食塩水を 120  $\mu$ L 尾静脈から投与した (n=5 ずつ)。5 分後に LISW 8 J を照射。3 時間後にマウスの肺、心臓、肝臓、脾臓および腎臓を病理学検査用に採取した。但し生理食塩水投与群は観察中死亡した場合、ただちに検体を採取。HE 染色を行って、定量評価として Yelvertons らの Pathological injury スコア<sup>8)</sup>を修正して、使用した。

Pathological injury スコア = (E + G + ST)  $\times$  (SD) 64 点満点

- Extent : 肺の受傷面積として、いくつの肺葉に損傷が及んでいるか (1~7 点)
- Grade : 病変の重症度として、各肺葉の何割が受傷しているか (1~4 点)
- Severity Type : 出血や損傷の重症度として、損傷は散在性か融合性であるか (1~5 点)
- Severity Depth/Disruption : 深度として、損傷は胸膜・実質まで及んでいるか (1~4 点)

7) 電子顕微鏡による観察

H12-ADP-liposome、生理食塩水を 120  $\mu$ L 尾静脈から投与した (n=2 ずつ)。LISW の 24 時間後に採取した。但し生理食塩水投与群は観察中死亡した場合、その時点で検体を採取した。

8) 気管支肺胞洗浄液 (BAL) 分析

H12-ADP-liposome (n=7)、ADP-liposome (n=3)、PBS-liposome (n=3)、生理食塩水 (n=3)、H12-ADP-liposome + ZM241385 (n=4)、H12-ADP-liposome + PSB 1115 (n=3)、前述のとおりそれぞれの薬物を投与してから LISW 8 J を右肺に照射し、3 時間後にマウスから BAL 液を採取した。BAL 液中アルブミン濃度は Bradford 法 (Bio Rad) で測定した。BAL 液中の TNF- $\alpha$  および MIP-2 濃度は ELISA 法 (R & D Systems) で定量した。

9) 統計解析

生存率は Wilcoxon signed rank test によって比較した。2 群間の統計は Student's *t* test を使用した。他は ANOVA を使用し、Bonferroni post-hoc test を行った。いずれも  $p < 0.05$  を統計的有意とした。

### 3. 結果

胸部 X 線は Blast Lung Injury 出血により右肺に浸潤影を示した。びまん性の出血が右葉および左肺門部に生じた (図 2 破線円内)。融合性の出血が、右肺下葉に生じた。LISW 強度による死亡閾値の検討では、8 J 以上で鼻出血 (咯血) ありのものはすべて 1 時間以内に死亡した。よって以後の生存率の検討では鼻出血 (咯血) のない場合を除外した。

1) 生存率比較

図 3 に示すように、H12-ADP-liposome 群が他群に比して有意に生存率が高かった。H12-ADP-liposome (9/13)、ADP-liposome (2/10)、PBS-liposome (0/10)、生理食塩水 (1/12) であった。アデノシン受容体拮抗薬は、H12-ADP-liposome による救命効果を阻害した。(ZM241385 : 0/6、

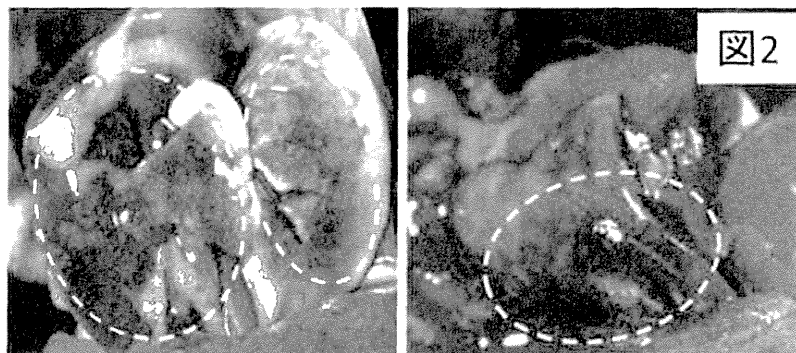
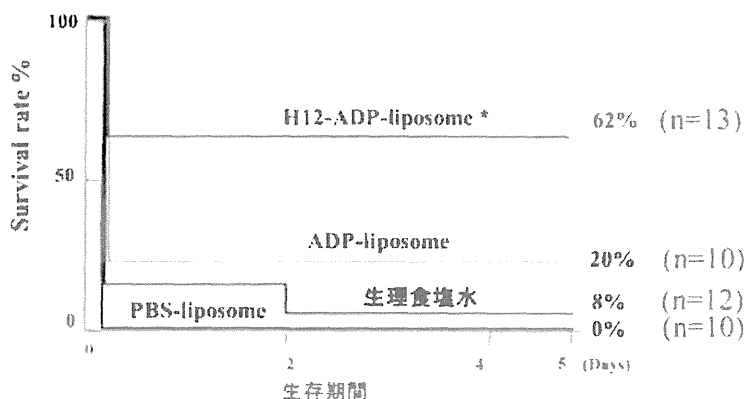


図2 Blast Lung Injury のマクロ像



\* p<0.014, mxn Chi square and Yates test

図3 予後の比較

表1 血算ならびに血液凝固機能データ

	LISW (-) (n=6)	Normal Saline (n=6)	H12-(ADP) -liposomes (n=6)	(ADP) -liposomes (n=5)	(PBS) -liposomes (n=5)
WBC count ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5.6 $\pm$ 2.1	2.1 $\pm$ 2.4*	4.0 $\pm$ 2.2	4.8 $\pm$ 1.8	5.3 $\pm$ 1.7
RBC count ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.0 $\pm$ 0.7	5.5 $\pm$ 2.2**	8.3 $\pm$ 1.0	8.0 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 1.1
Hemoglobin concentrations (g/dL)	12.8 $\pm$ 1.4	8.6 $\pm$ 3.7*	13.6 $\pm$ 3.1	13.3 $\pm$ 1.2	13.1 $\pm$ 1.8
Platelet counts ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	238 $\pm$ 71 <sup>†</sup>	99 $\pm$ 54	111 $\pm$ 29	109 $\pm$ 19	99 $\pm$ 23
Clotting time (CT) (sec)	65 $\pm$ 14 <sup>†</sup>	131 $\pm$ 79	134 $\pm$ 58	119 $\pm$ 33	129 $\pm$ 19
Clotting rate (CR)	32.5 $\pm$ 5.5 <sup>†</sup>	15.0 $\pm$ 6.7	14.0 $\pm$ 6.1	19.2 $\pm$ 8.1	14.70 $\pm$ 1.4

Hematological parameters and coagulation factors/activities in mice after LISW exposure (followed by administration of Normal Saline, H12-(ADP)-liposomes, (ADP)-liposomes or (PBS)-liposomes.) Data are mean  $\pm$ SD, \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. LISW (-), H12-(ADP)-liposomes, (ADP)-liposomes or (PBS)-liposomes. <sup>†</sup>p<0.01 vs. Normal Saline, H12-(ADP)-liposomes, (ADP)-liposomes or (PBS)-liposomes

PSB1115 : 1/6)

2) Sonoclot<sup>®</sup>による血液凝固評価と血算

LISW (-) すなわち Blast Lung Injury なしでは、H12-ADP-liposome、ADP-liposome、PBS-liposome、生理食塩水のいずれを投与した場合でも Sonoclot<sup>®</sup>波形に相違はなく、CT や CR は対照

## 衝撃波による致死肺出血マウスに対する人工血小板 (H12-ADP-liposome) の救命効果

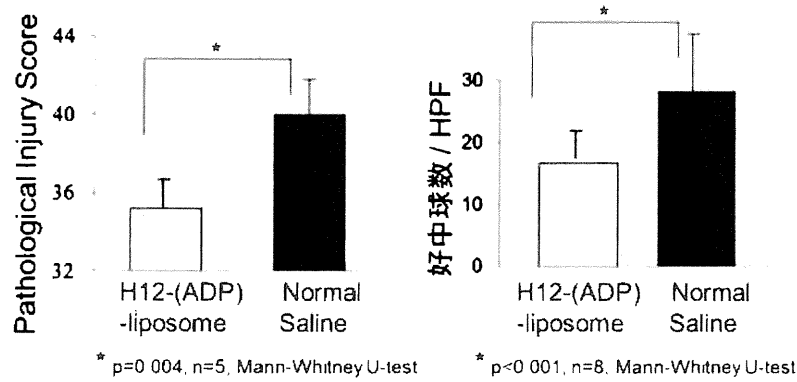


図4 肺病理の定量評価

群と変化なかった。LISW による Blast Lung Injury ありでは、H12-ADP-liposome、ADP-liposome、PBS-liposome、生理食塩水のいずれを投与した場合でも同様にCTが2倍に延長しCRは半減した。血小板数も半減した(表1)。

## 3) 病理組織所見

肺以外の心臓、肝臓、脾臓および腎臓には血栓症などの異常所見はなかった。肉眼所見としては、どちらの群でも右肺には融合性の出血が生じた。左肺では、生理食塩水投与群で融合性出血が生じた一方で、H12-ADP-liposome 投与群では、軽度の散在性出血がみられるに過ぎなかった。Pathological injury スコアはH12-ADP-liposome 投与群 (40.0±2.0) が生理食塩水投与群 (35.2±2.3) に対して有意に軽減していた(図4左)。さらに、肺胞における1視野あたりの好中球数についても、H12-ADP-liposome 投与群 (16.7±6.2) が生理食塩水投与群 (28.4±8.5) に対して有意に軽減していた(図4右)。

## 4) 電子顕微鏡所見

肺胞壁の毛細血管の変形・破断とともに肺胞内に赤血球が漏出していた(図5A)。好中球浸潤も認められた(図5B)。H12-ADP-liposome 投与群では毛細血管内で血小板と結合するH12-ADP-liposome 像が認められた(図5C)。

## 5) BAL 分析

LISW 照射3時間後のBAL液中のアルブミン漏出はH12-ADP-liposome 投与群においてのみ有意に減少していた(図6A)。さらにH12-ADP-liposome 投与は、BAL液中のTNF- $\alpha$ およびMIP-2の過剰発現を有意に軽減した。アデノシンA2A受容体拮抗薬は、H12-ADP-liposome 投与によるBAL液中のTNF- $\alpha$ 減少効果を阻害した。アデノシンA2B受容体拮抗薬はH12-ADP-liposome 投

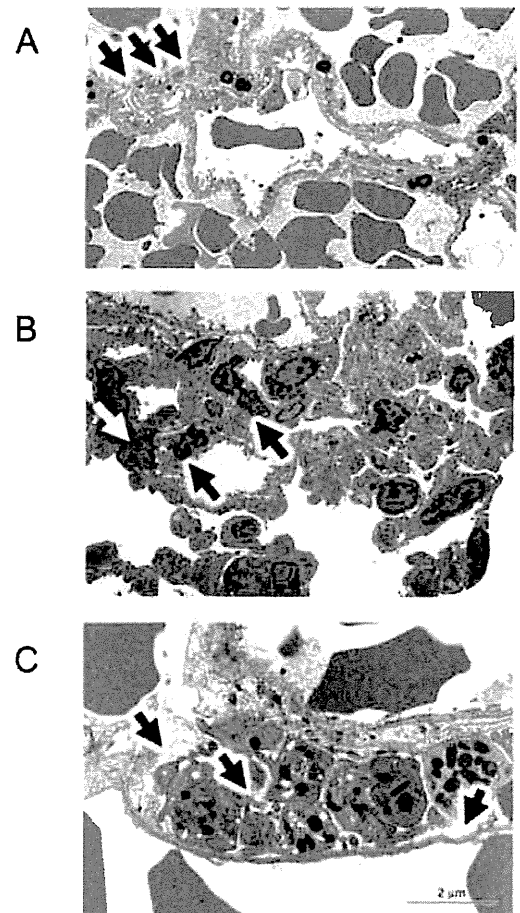


図5 肺透過型電子顕微鏡像

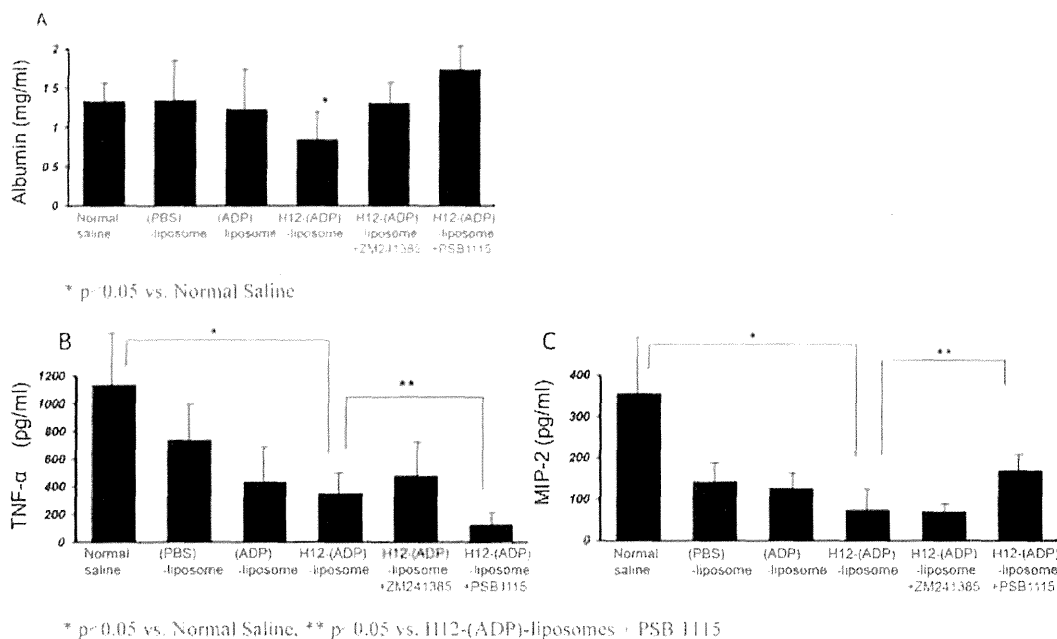


図6 気管支肺胞洗浄液解析結果

与による BAL 液中の MIP-2 の減少効果を阻害した (図 6B、C)。

#### 4. 考察

LISW 衝撃波による致死性肺出血マウスにおいて、H12-ADP-liposome は肺出血を軽減し、生存率を増加させた。病理学的には肺胞壁の伸展と毛細血管の破壊に伴う肺胞出血の所見は、Tsokos らによって報告されたヒトの Blast Lung Injury の病理所見<sup>9)</sup>と合致した。

Yelverton らは Pathological injury スコア 36 点以上を重症肺傷害と定義している<sup>8)</sup>が、今回 H12-ADP-liposome 投与により、36 点以下に軽減できており、生命予後を改善したと合致している。LISW 照射側の右肺は H12-ADP-liposome 群でも生理食塩水投与群と同様に、融合性の出血が臓器の深部に亘り、所見に差異はない。むしろ非照射側である左肺の出血が限局されたことが予後の改善につながっていると推察される。これは LISW の衝撃波は経気道的に反対側の肺胞を傷害すると同時に、照射側肺の肺胞マクロファージから放出された炎症性サイトカインが反対側の肺胞上皮、毛細血管に作用することを H12-ADP-liposome が抑制しているものと考えられた。すなわち、H12-ADP-liposome は本来の止血作用とともに、局所で放出される ADP が病変部で代謝されアデノシン作用を示すのではないかと考えられる。一般に、生理学的濃度でアデノシンは A1、A2A および A3 受容体を活性化する。対照的に、アデノシン A2B 受容体は高濃度のアデノシンで作用すると考えられている<sup>10)</sup>。出血性ショックではアデノシンは病変局所で細胞外に放出される。とくに低酸素病態を伴う場合にアデノシン A2B 受容体作用が活性化することが報告されている<sup>11)</sup>。

今回、アデノシン受容体拮抗薬を使った薬理的検討では、Blast Lung Injury による好中球誘導性ケモカインである MIP-2 放出亢進と好中球の遊走浸潤を H12-ADP-liposome 投与が A2B 受容体を介して抑制し、急性期の予後の改善につながっていたことが示唆された。しかしながら、炎症性サイトカインの TNF-α については確定的なデータは得られなかった。

この Blast Lung Injury モデルでは急性肺傷害の病態が複合している。肺胞壁の機械的過進展に関

---

 衝撃波による致死肺出血マウスに対する人工血小板 (H12-ADP-liposome) の救命効果
 

---

しては、人工呼吸による肺外傷 (VILI) に類似している。また低酸素症/低血圧の遷延に関しては、虚血再灌流傷害モデルに類似している。VILI に関しては、Eckle らが肺胞・毛細血管バリアの欠損が肺の A2B 受容体を介して減じられると報告した<sup>12)</sup>。さらに、A2B 受容体を介して VILI による毛細血管から肺胞への vascular leak を軽減することに寄与し、A2B 受容体作動薬がある種の「肺利尿」効果を示し、肺胞クリアランスが改善して臓器保護につながっていると述べている<sup>12)</sup>。さらに Eckle らは低酸素換気モデルで生じる肺胞への好中球の遊走浸潤が A2B 受容体を介して抑制されることも報告している<sup>11)</sup>。

Haskó らは、A2A 受容体を介するアデノシンの外傷/出血性ショック軽減効果を報告している<sup>13)</sup>。一般的にも A2A 受容体を介したアデノシンの抗炎症効果の報告が多い。しかしながら、衝撃波により誘起された臓器傷害病態におけるアデノシンの役割は不明な点が多い。血漿中のアデノシンの半減期が非常に短い (1~2 秒) ことが、外因性に投与したアデノシンの実験結果の解釈を難しくしている。本研究では H12-ADP-liposome の止血作用が病態にどの程度貢献していたかは不明であり、今後さらなる検討が必要である。

## 結論

H12-ADP-liposome 投与は衝撃波による致死肺出血の救命に有用である可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究は JSPS 科研費 25462843 の助成を受けたものです。

## 文献

- 1) Savage O: Pulmonary concussion ('blast') in nonthoracic battle wounds. *Lancet* 1: 424-429, 1945
- 2) Cooper GJ, Maynard RL, Cross NL, et al: Casualties from terrorist bombings. *J Trauma* 23: 955-967, 1983
- 3) DePalma RG, Burris DG, Champion HR, et al: Blast injuries. *N Engl J Med* 352: 1335-1342, 2005
- 4) Horrocks CL: Blast injuries: biophysics, pathophysiology and management principles. *J R Army Med Corps* 147: 28-40, 2001
- 5) Okamura Y, Takeoka S, Eto K, et al: Development of fibrinogen gamma-chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J Thromb Haemost* 7: 470-477, 2009
- 6) Nishikawa K, Hagsisawa K, Kinoshita M, et al: Fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage. *J Thromb Haemost* 10: 2137-2148, 2012
- 7) Satoh Y, Sato S, Saitoh D, et al: Pulmonary blast injury in mice: a novel model for studying blast injury in the laboratory using laser-induced stress waves. *Lasers Surg Med* 42: 313-318, 2010
- 8) Yelveton JT: Pathology scoring system for blast injuries. *J Trauma* 40: S111-115, 1996
- 9) Tsokos M, Paulsen F, Petri S, Histologic, immunohistochemical, and ultrastructural findings in

- human blast lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 549-555, 2003
- 10) Fredholm BB: Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 14: 1315-1323, 2007
  - 11) Eckle T, Faigle M, Grenz A, et al: A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. *Blood* 111: 2024-2035, 2008
  - 12) Eckle T, Grenz A, Laucher S, et al: A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *J Clin Invest* 118: 3301-3315, 2008
  - 13) Haskó G, Xu DZ, Lu Q, et al: Adenosine A2A receptor activation reduces lung injury in trauma/hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 34: 1119-1125, 2006



## 人工血小板開発の現状と今後の展望

慶應義塾大学医学部輸血・細胞療法センター  
半田 誠 Makoto HANDA

### はじめに

我が国では急速な少子高齢化に伴い、献血人口の減少と悪性腫瘍などの増加による輸血需要が高まり、近い将来の血液製剤の払底が危惧されており、それを代替する人工血液の開発が進められてきた。厳密な取扱いを要する輸血用血液製剤のなかでもとりわけ血小板濃厚液は、その機能を保持するために、室温(22℃)、水平震盪条件下で保存しなければならず、その有効期限も採血後4～7日(我が国は4日)と短い。従って、血小板濃厚液を医療現場で常備することは事実上不可能(我が国では予約制)であり、災害や事故、産科的領域に合併した突発的な大量出血に緊急対応することは極めて困難である。血小板製剤の欠点を克服し、長期保存可能で常時使用できる人工物の開発が、米国において主に軍事目的で始まってからすでに50年以上が経過した<sup>1,2)</sup>。残念ながら、未だ実用化には至っていないが、幾つかの有望な試験物が報告され、一部は初期臨床試験に供され、将来の製剤化への取組みが継続されている<sup>2,3)</sup>。血小板の止血機能や血小板輸血の適応と対比して、人工血小板の開発の現状と今後の展望を概説する。

### 人工血小板の設計戦略

#### 1. 血小板の作用機序(図1)

血小板の最も重要な生理機能は、止血カスケードにおいて1次血栓を形成し、さらに凝固系の活性化を仲介してフィブリンによる強固な2次血栓を誘導することである。実際、血管壁の破綻により露出したコラーゲンなどの内皮下組織成分やそこに特異的に集積した血漿のフォン・ビレブランド因子(以下、VWF)をリガンドとして、血小板はその表面にある接着因子受容体(それぞれ、GPVIとGPIIb/IX複合体)を介して認識して、止血部位に集積し、その表面を覆うように伸展する(血小板

粘着)。活性化された血小板は、アデノシン2リン酸(以下、ADP)などの顆粒内容物を放出し、トロンボキサンA2を産生して、さらに強力な活性化を受けるとともに、活性化依存性の受容体であるGPIIb/IIIa複合体( $\alpha$ IIb $\beta$ 3インテグリン)とそのリガンドの血漿フィブリンゲンが結合して、互いに架橋を形成することで血小板凝集が惹起され、1次血栓が形成される(血小板放出反応と血小板凝集)。活性化された血小板の表面にはフォスファチジルセリンなどの陰性荷電を有するリン脂質が露出して、その表面で凝固カスケードが爆発的に進行し、トロンビンの産生に伴うフィブリン血栓の形成が誘導され(血小板凝固活性)、止血血栓が完成する。

#### 2. 人工血小板の設計戦略

生きた血小板を模して、上記の複雑に連動した一連の細胞反応を人工的に創出することは事実上不可能である。幸いに、血小板輸血が必要な場合でも患者の血小板が全くゼロになることはない。そこで、人工血小板として、止血局所に集積する残存血小板に働いて、著しく低下している1次止血機能を増強する薬物をつくり出すことが現実的かつ合理的である。すなわち、人工血小板は血小板の代わりとなるものではなく、あくまでも血小板の機

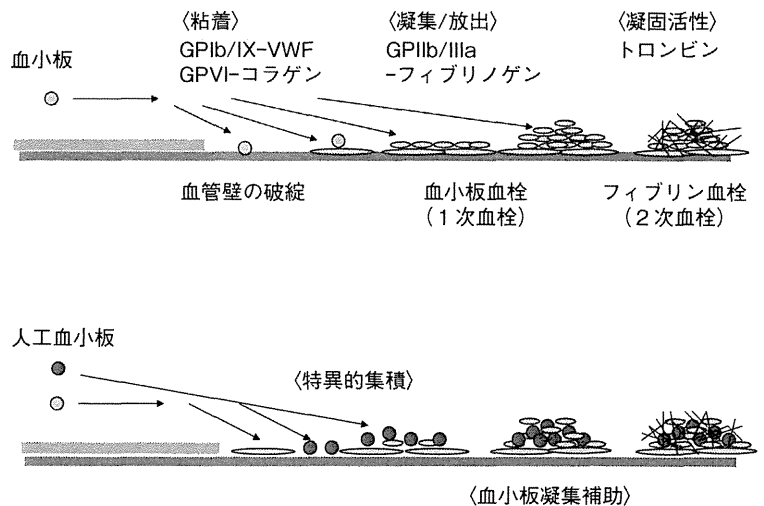
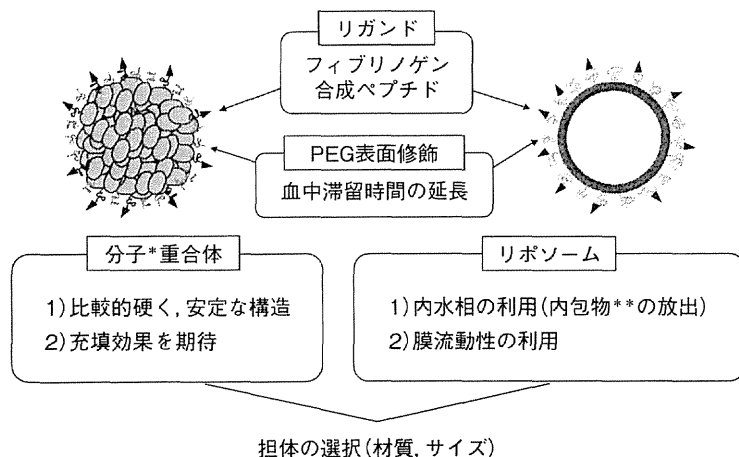


図1 止血血栓の形成と人工血小板の機能

能を補強もしくは増強することで、血小板減少症や機能低下症などで障害されている1次止血機能を補助する(血小板代替薬)かあるいは止血機能を増強する薬剤(止血薬)として開発されている。

人工血小板創製への最初の試みは、フィブリノゲンあるいはその関連合成ペプチド(GPIIb/IIIa複合体結合部位)を共有結合で表面修飾したヒト赤血球である。フィブリノゲン結合赤血球は*in vitro*でアゴニスト惹起血小板凝集を用量依存性に増強し、血小板が減少したラットの延長した出血時間を短縮した<sup>4)</sup>。フィブリノゲンの $\alpha$ 鎖の2カ所に存在してGPIIb/IIIa複合体と特異的に結合する最少単位であるArginine-Glycine-Asparatic acid(以下, RGD)配列を含む合成ペプチド(CGCRGDF)が結合した赤血球(thromboerythrocyte)も同様の血小板凝集増強作用を認めた<sup>5)</sup>。これらの修飾赤血球は、アゴニストにより活性化された血小板と、フィブリノゲンの活性化依存性受容体のGPIIb/IIIa複合体を介して選択的に結合することで、血小板血栓(血小板凝集)を増強する。これらの報告をきっかけとして、人工血小板として、流血中の活性化されていない血小板とは結合せずに、止血部位に集積した活性化血小板を特異的に認識する粒子を設計する方向性が確立された(図1)。すなわち、生体適合性に優れた担体を選択し、血中滞留時間をできるだけ延長させるためにポリエチレングリコール鎖(以下, PEG)で表面修飾し、活性化血小板を標的として、止血局所への特異的な集積を誘導するリガンドを結合させた微粒子の開発が次々と行われ、現在に至っている(図2)。リガンドとしてはフィブリノゲンあるいはその結合単位配列(RGDあるいはH12)を含んだ合成ペプチドが用いられている。



\*: ヒトアルブミン, PLGA  
 \*\*: ADP

図2 人工血小板の設計



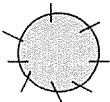




## 人工血小板の開発状況

広義の人工血小板は、ヒト由来の血小板もしくはその断片を用いた血小板由来産物(platelet products)と、一部もしくはすべての構成成分が人工物であるいわゆる狭義の人工血小板(artificial platelets)に大別される<sup>1-3)</sup>。前者には、凍結乾燥処理したヒト血小板(Stasix<sup>TM</sup>, Thrombosomes<sup>TM</sup>)と血小板膜断片(infusible platelet membrane: IPM)(Cyplex<sup>TM</sup>)がある。後者は、担体としてアルブミン微粒子、リン脂質小胞体:リポソームおよびポリ乳酸/グリコール酸共重合体(poly(lactic-co-glycolic acid):以下, PLGA)を用い、その表面にフィブリノゲンやその合成ペプチド(RGDあるいはH12)などをコートした微粒子が開発され、ヒトフィブリノゲンを表面固定したアルブミン微粒子(Synthocyte<sup>TM</sup>やFibrinoplate-S<sup>TM</sup>)が初期臨床試験に供された<sup>2,3)</sup>。ヒト由来のアルブミン(遺伝子組換えアルブミンが開発されている)やフィブリノゲンを使用したものは生物由来製剤として規制を受けるため、開発の方向性は生物由来成分を一切使用しない完全型人工血小板にシフトしてきた(図3)。

### 1. フィブリノゲン結合アルブミン微粒子

1995年には、平均径が1.2 $\mu$ mのアルブミン・マイクロスフェア(Fibrinoplate-S<sup>TM</sup>)が、1999年には、より大型の平均径3.5~4.5 $\mu$ mのアルブミン・マイクロカプセル(Synthocyte<sup>TM</sup>)が報告され、前者はフェーズIII、後者は少なくともフェーズIIまでの臨床試験が行われた。特に、Fibrinoplate-S<sup>TM</sup>は、63,214人の白血病や再生不良性貧血等の血小板減少患者(血小板数3万/ $\mu$ L以下)

への二重盲検比較対照試験で、出血時間の短縮効果が投与後24時間後でも有意に持続することが報告された<sup>6)</sup>。一方、Synthocyte<sup>TM</sup>は、抗がん剤により惹起された血小板減少ウサギに投与することで耳介出血時間の短縮や腹部手術モデルでも術創からの出血量の減少効果が一定時間(3時間)持続し、止血局所への集積も形態的に証明され、有望な前臨床試験結果が公表された<sup>7)</sup>。しかしながら、いずれもその後の経過の詳細は公表されておらず、未だ実用化に至っていない。さらに、第3の有望な人工物(HaemoPlax<sup>TM</sup>)が開発されている。このHaemoPlax<sup>TM</sup>は、アルブミン・マイクロスフェアの表面に、ヒトフィブリノゲンと高い親和性を有する合成ペプチドが固相

リガンド	担体/サイズ	製品名/報告者	適応	開発フェーズ
<b>■血小板由来産物 (凍結乾燥品)</b>				
	Lyophilized whole platelets	(Stasix™ : Entegriion) (Thrombosomes™ : Cellphire)	止血剤	前臨床
	Platelet membrane fragments	Infusible Platelet Membrane (Cyplex™ : Cypress Bioscience)	予防, 治療	臨床 I / II (開発中止)
<b>■人工血小板：リガンド結合微粒子</b>				
Human Fibrinogen				
	Alb microcapsules (3.5-4.5 μm)	(Synthocytes™ : ProFibrix)	予防, 治療	臨床 I / II (開発中止)
Human Fibrinogen				
	Alb microspheres (1.2 μm)	(fibrinoplate-S™ : Advanced Therapeutics) (HaemoPlax™ : Haemostatix)	予防, 治療	臨床 II / III 前臨床
Human fibrinogen peptide (H12)				
	liposomes (0.22 μm)	(Y. Okamura <i>et al</i> , 2005-2009) (Y. Nishikawa <i>et al</i> , 2012)	治療	前臨床
Human fibrinogen peptide (RGD)/VBP & CBP				
	liposomes (0.15 μm)	(A. Sen Gupta <i>et al</i> , 2012)	止血剤	前臨床
Human fibrinogen peptide (RGD)				
	PLGA (0.17 μm)	(J.P. Bertram <i>et al</i> , 2009)	止血剤	前臨床

完全型人工物

VBP : VWF-binding peptide, CBP : collagen-binding peptide

図3 人工血小板の開発状況

化されたもので、血中に投与すると、その表面にフィブリノゲンが速やかに吸着されることで、上記の人工物と同様の血小板代替機能を発揮するという。前臨床試験はすでに終了して、早期の臨床試験への移行を表明しているが、詳細は明らかでない。

2. フィブリノゲンペプチド結合ADP内包化リポソーム  
フィブリノゲンのGPIIb/IIIa複合体への結合部位は2カ所ある。1つはα鎖のRGD配列で、もう1つがγ鎖のカルボキシ末端を構成する12個のアミノ酸配列(400HHLGGAKQAGDV411 : H12)である。そこで、表面結合リガンドとしてRGD配列の代わりにH12合成ペプチドを、担体として血液適合性に優れかつすでに臨床応用がなされているリポソームを使用した完全型人工血小板(H12 (ADP) リポソーム)が開発された。RGD配列はGPIIb/IIIa複合体以外のインテグリン・ファミリーにも認識され、血小板への特異性は高くない。一方、H12はGPIIb/IIIa複合体に限定された結合部位であり、結合親

和性は低いものの、活性化血小板への特異性は極めて高い。H12 (ADP) リポソームは平均直径220nmのナノ微粒子で、その止血作用を強化する目的で細胞活性化とともに血小板より放出される生理的な血小板刺激物質のADPを内包化させている(図4)<sup>8)</sup>。H12 (ADP) リポソームは活性化した血小板に結合することで、出血部位に特異的に集積し、血小板凝集を増強するとともに、凝集依存性に内包化されたADPを放出することで、血小板に匹敵する止血効果(出血時間短縮効果)を発揮することが抗がん剤惹起ウサギ血小板減少症モデルで報告された。交通事故などの多発性外傷や臓器損傷に伴う大量出血は、血小板減少を伴って出血性ショックに陥りやすく、血小板輸血が必要となる。しかしながら、実際の医療現場では血小板製剤は入手困難であり、人工血小板のよい適応である。肝臓損傷による大量出血ウサギモデルでの検討では、H12 (ADP) リポソームは血小板輸血と同等の止血効果と救命率を示した(図5)<sup>9)</sup>。H12 (ADP) リポソ

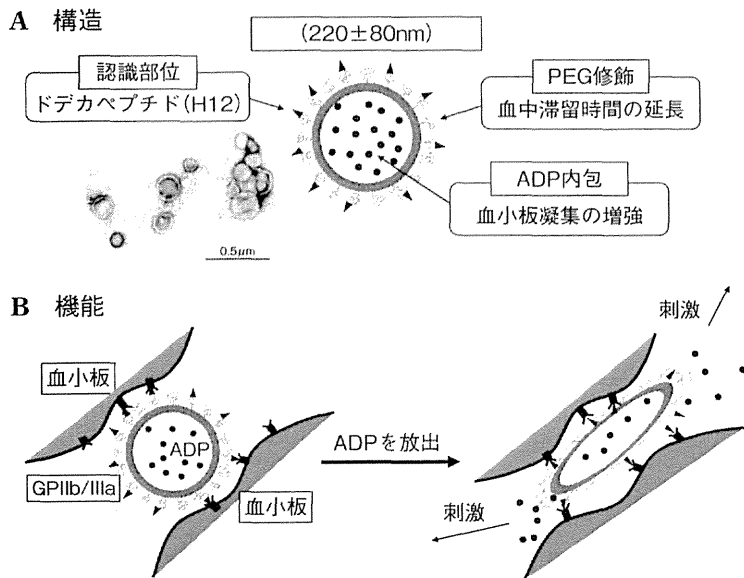
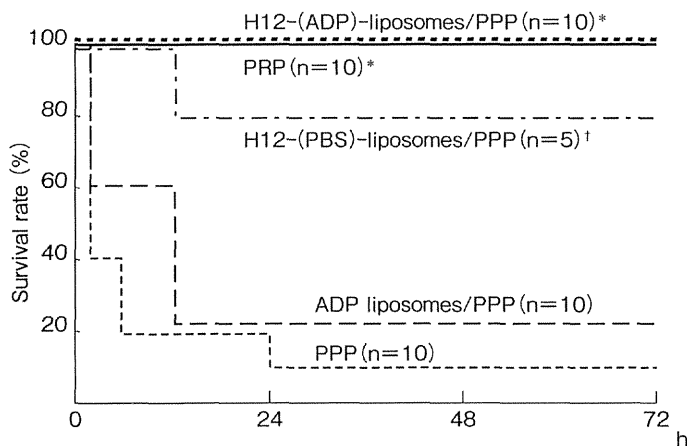


図4 H12 (ADP) リポソーム



全血脱血と洗浄赤血球の返血を8回繰返し作成した稀釈性血小板減少症ウサギにH12 (ADP) リポソーム (20mg/kg) と乏血小板血漿 (PPP) を投与し、15分後に肝臓に貫通性損傷を与え、輸液のみの処置にて、動物の予後を観察。比較対照として、多血小板血漿 (PRP)、PPPのみ、H12未結合リポソーム (ADP-リポソーム) およびADP未内包リポソーム (H12-PBSリポソーム) を用いた。

\* : p<0.01 vs. PPP or ADPリポソーム,

† : p<0.01 vs. PPP and p<0.05 vs. ADPリポソーム

〈文献9〉より引用

図5 肝臓外傷による大量出血ウサギモデルにおけるH12 (ADP) リポソームの救命効果

ムの利点は、その表面をポリエチレングリコールで修飾することでその血中滞留時間を長く (平均6時間) でき、かつ肝臓などの臓器への蓄積性を認めないことである<sup>10)</sup>。

### 3. 多種類ペプチド結合リポソーム

ナノ粒子であるPEG表面修飾リポソームに3種類の合成ペプチドを付加した多機能型の人工血小板が最近開発された<sup>3,11)</sup>。活性化血小板への特異性を高めた環状RGDペプチドとともに、血小板粘着の標的分子であるコラゲ

ンとVWFの結合配列由来の合成ペプチド (それぞれCBPおよびVBP) を結合したリポソームは、血小板凝集増強機能ばかりでなく血小板粘着のプロセスにも直接関与して、血小板による止血機能を増強するとされる (図1)。実際、健常マウスの尾切出血時間を強力に短縮する作用が認められていることから、止血薬としての開発の方向性が示唆される。一方、血小板輸血の適応となる血小板減少症への効果については定かではない。

### 4. フィブリノゲンペプチド結合低分子ポリマー

この人工物は、生体吸収性に優れて多方面の医療材料に利用されているPLGAを担体として用い、その表面をPEGで修飾し、その先端にRGD配列を含んだペプチド (GRGDS) を結合させた、粒径およそ170nmの微粒子である<sup>12)</sup>。本微粒子は、活性化した血小板にのみ結合して血小板の凝集を増強し、健常マウスの大腿動脈からの出血を陰性対照物に比して有意により短時間で止める機能がある。しかし、投与量を多くすると血栓傾向が増強されるとされ、また血中半減期も極めて短いことから、止血薬としての適応を目的としているようである。少なくとも、緊急避難的に止血薬として欧米では標準的に使用されているリコンビナント活性化凝固第VII因子 (Novoseven<sup>TM</sup>) をはるかに凌駕する止血効果を示している。

## 今後の展望

開発中の人工血小板の方向は、血小板代替薬か止血薬かである。血小板製剤に代わって何時でもどこでも使える長所がある反面、血小板を介してその機能が発揮されることから血小板が極端に減った状態で果たして機能するか未だに明らかでない点が不安材料である。さらに、止血予防を目的とした場合は時間的に余裕のあるためその効果が確実な血小板製剤でこと足りる。従って、外傷出血等で緊急に使用する場合に適応は限られ、利潤を追求する企業にとっては開発意欲が削がれる。一方、血小板数にかかわらず使用できる止血薬であれば、企業的なインセンティブも働く。ただし、安全性において止血機能亢進作用は血栓傾向増強作用と表裏一体である。従って、現時点では戦場での緊急避難的な適応が第1のターゲットとなっている。米国等の国防予算により支援

されたバイオベンチャーが開発を主導している現状から、詳細なデータはほとんど公表されていない。開発プロセスが公表されているのは、唯一我が国の公的資金の支援により開発が進められているH12(ADP)リポソームのみである。

引用文献

- 1) M.A. Blajchman : Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients, *J Thromb Haemost*, **1**, 1637-1641 (2003).
- 2) 半田 誠 : 人工血小板, *脈管学*, **51**, 333-378 (2011).
- 3) C.L. Modery-Pawlowski, L.L. Tian *et al.* : Approaches to synthetic platelet analogs, *Biomaterials*, **34**, 526-541 (2013).
- 4) G. Agam, A.A. Livine : Erythrocytes with covalently bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia, *Eur J Clin Invest*, **22**, 105-112 (1992).
- 5) B.S. Collier, K.T. Springer *et al.* : Thromboerythrocytes, In vitro studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusion, *J Clin Invest*, **89**, 546-555 (1992).
- 6) Advanced Therapeutics Inc. HP : <http://www.advtx.com/Fibrinoplate-s-details.htm>
- 7) M. Levi, P.W. Friedrich *et al.* : Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits, *Nat Med*, **5**, 107-111 (1999).
- 8) 岡村陽介, 半田 誠 : ナノ粒子と血小板の相互作用 : 完全人工系血小板代替物への応用を目指して, *International Review of Thrombosis*, **8**, 34-41 (2013).
- 9) K. Nishikawa, K. Hagiwara *et al.* : Fibrinogen  $\gamma$ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage, *J Thromb Haemost*, **10**, 2137-2148 (2012).
- 10) K. Taguchi, H. Ujihira *et al.* : Pharmacokinetic Study of the Structural Components of Adenosine Diphosphate-encapsulated Liposomes Coated with Fibrinogen  $\gamma$ -Chain Dodecapeptide as a Synthetic Platelet Substitute, *Drug Metab Dispos*, 2013 (in press).
- 11) C.L. Modery-Pawlowski, L.L. Tian *et al.* : In vitro and in vivo hemostatic capabilities of a functionally integrated platelet-mimetic liposomal nanoconstruct, *Biomaterials*, **34**, 3031-3041 (2013).
- 12) J.P. Bertram, C.A. Williams *et al.* : Intravenous hemostat: nanotechnology to halt bleeding, *Sci Transl Med*, **1**, 11-22 (2011).

# Epitope Mapping for Monoclonal Antibody Reveals the Activation Mechanism for $\alpha V\beta 3$ Integrin

Tetsuji Kamata<sup>1\*</sup>, Makoto Handa<sup>2</sup>, Sonomi Takakuwa<sup>1</sup>, Yukiko Sato<sup>1</sup>, Yohko Kawai<sup>3</sup>, Yasuo Ikeda<sup>4</sup>, Sadakazu Aiso<sup>1</sup>

**1** Department of Anatomy, Keio University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, **2** Center for Transfusion Medicine and Cell Therapy, Keio University School of Medicine, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan, **3** Preventive Health Examination Center, International University of Health and Welfare, Minato-ku, Tokyo, Japan, **4** The Faculty of Science and Engineering, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan

## Abstract

Epitopes for a panel of anti- $\alpha V\beta 3$  monoclonal antibodies (mAbs) were investigated to explore the activation mechanism of  $\alpha V\beta 3$  integrin. Experiments utilizing  $\alpha V/\alpha IIb$  domain-swapping chimeras revealed that among the nine mAbs tested, five recognized the ligand-binding  $\beta$ -propeller domain and four recognized the thigh domain, which is the upper leg of the  $\alpha V$  chain. Interestingly, the four mAbs included function-blocking as well as non-functional mAbs, although they bound at a distance from the ligand-binding site. The epitopes for these four mAbs were further determined using human-to-mouse  $\alpha V$  chimeras. Among the four, P3G8 recognized an amino acid residue, Ser-528, located on the side of the thigh domain, while AMF-7, M9, and P2W7 all recognized a common epitope, Ser-462, that was located close to the  $\alpha$ -genu, where integrin makes a sharp bend in the crystal structure. Fibrinogen binding studies for cells expressing wild-type  $\alpha V\beta 3$  confirmed that AMF-7, M9, and P2W7 were inhibitory, while P3G8 was non-functional. However, these mAbs were all unable to block binding when  $\alpha V\beta 3$  was constrained in its extended conformation. These results suggest that AMF-7, M9, and P2W7 block ligand binding allosterically by stabilizing the angle of the bend in the bent conformation. Thus, a switchblade-like movement of the integrin leg is indispensable for the affinity regulation of  $\alpha V\beta 3$  integrin.

**Citation:** Kamata T, Handa M, Takakuwa S, Sato Y, Kawai Y, et al. (2013) Epitope Mapping for Monoclonal Antibody Reveals the Activation Mechanism for  $\alpha V\beta 3$  Integrin. *PLoS ONE* 8(6): e66096. doi:10.1371/journal.pone.0066096

**Editor:** Donald Gullberg, University of Bergen, Norway

**Received:** January 30, 2013; **Accepted:** May 2, 2013; **Published:** June 20, 2013

**Copyright:** © 2013 Kamata et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Health and Labor Sciences Research Grants (Research on Public Essential Drugs and Medical Devices) from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (to TK and MH), and by a grant from Keio Gijuku Fukuzawa Memorial Fund for the Advancement of Education and Research, Japan (to TK). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: kamata@z7.keio.jp

## Introduction

Integrins are a family of  $\alpha/\beta$  heterodimeric transmembrane cell surface receptors that mediate the cell-extracellular matrix and cell-cell interactions. The hallmark of integrin-dependent adhesive interactions is their regulation by intracellular signaling events (inside-out signaling). In addition to mediating adhesive interactions, liganded integrins initiate signals inside the cell to modify cell behavior (outside-in signaling) [1]. This integrin-mediated bidirectional signaling is closely associated with the structural rearrangement of the integrin itself. The crystal structure of the extracellular domains of  $\alpha V\beta 3$  and  $\alpha IIb\beta 3$  integrin revealed that the  $\alpha$  chain consists of the N-terminal  $\beta$ -propeller domain followed by the thigh, calf-1, and calf-2 domains and that the  $\beta$  chain consists of the PSI,  $\beta A$ , hybrid, four EGF, and  $\beta T$  domains [2,3]. The  $\beta$ -propeller and the  $\beta A$  domains non-covalently associate with each other to form a globular head that is observable using conventional electron microscopy (EM) [4]. By contrast, the thigh, calf-1, and calf-2 domains of the  $\alpha$  chain and the PSI, hybrid, EGF, and  $\beta T$  domains of the  $\beta$  chain form a leg-like region, respectively. The most striking feature revealed in the crystal structure is the orientation of the head. The two legs in the crystal structure fold back at a 135-degree angle between the thigh and the calf-1 domains and between the EGF-1 and EGF-2 domains, unlike the straight leg observed using conventional EM. Conse-

quently, the head region points downward, facing the plasma membrane. The discrepancies between these two structures were reconciled by a high-resolution EM image of the extracellular domains of recombinant  $\alpha V\beta 3$  integrin [5]. These observations revealed that  $\alpha V\beta 3$  could adopt multiple distinct structures, including the bent and the extended conformers observed in the crystal structure and conventional EM studies, respectively. Since  $Mn^{2+}$  and ligand peptide significantly increased their number, the extended form appeared to represent the high-affinity state, and the bent conformer was thought to represent the low-affinity state. Thus, the transition from one conformer to the other (the so-called switchblade-like movement) might account for the affinity regulation of the integrin. Consistent with these findings, genetically engineered  $\alpha IIb\beta 3$  constrained in the bent state interfered with the binding of macromolecular ligands, while  $\alpha IIb\beta 3$  constrained in the extended state exhibited maximal activation [6,7]. Finally,  $\alpha IIb\beta 3$  embedded in nanodiscs underwent extension in the presence of a talin head domain that binds to the  $\beta 3$  cytoplasmic domain, suggesting that the switchblade-like transition actually occurs during inside-out signaling [8]. Aside from the switchblade-like movement, substantial structural rearrangement has been observed in the head region. An EM study of  $\alpha 5\beta 1$  integrin complexed with a fibronectin fragment revealed that the  $\beta$  hybrid domain swings out upon ligand binding [9]. The

crystal structures of  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 head regions complexed with short ligand peptides or ligand mimetics have provided detailed information [3,10]. This swing-out movement is accompanied by the rearrangement of the ligand-binding and/or cation-binding loops in the  $\beta$ A domain, thereby regulating ligand binding. In agreement with these findings, attempts to constrain the movement of the hybrid domain in a swing-out (open headpiece) or a swing-in (closed headpiece) position revealed that this movement is critical not only for  $\beta$ 3 integrin activation [7,11], but also for  $\beta$ 1 and  $\beta$ 2 integrins [12–14]. Thus, these results suggest that extension and an open headpiece conformation are independently required for high-affinity ligand binding.

However, contradicting reports have suggested that integrin extension is not an essential event for ligand binding. The crystal structure of  $\alpha$ V $\beta$ 3 complexed with a small peptide ligand revealed that the bent conformer is capable of binding a ligand [15]. Understandably,  $\alpha$ V $\beta$ 3 was unable to undergo gross structural rearrangements upon ligand binding under the constraints of the crystal lattice in this experiment. However, a single particle analysis of  $\alpha$ V $\beta$ 3 complexed with a recombinant fibronectin fragment has shown that  $\alpha$ V $\beta$ 3 can bind to a macromolecular ligand when it is in a bent state in the presence of  $Mn^{2+}$  [16]. The measurement of fluorescent energy transfer between the mAb bound to the  $\beta$ -propeller domain and the plasma membrane in live cells revealed that  $\alpha$ V $\beta$ 3 remains in a bent conformation when activated by  $Mn^{2+}$  or an activating mutation [17]. These lines of evidence suggest that the bent conformer is capable of binding not only small ligands, but also macromolecular ligands without undergoing substantial structural rearrangements of  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin.

Most of the structural and/or functional studies on integrins described above have been performed using genetically manipulated molecules. Thus, it is impossible to negate the possibility that those manipulations could have an unexpected effect on the folding/gross structure of the molecule. If this were the case, interpretation of the whole data would be jeopardized. For these reasons, alternative approach is required to investigate the mechanism of integrin activation. In this study, we examined epitopes for numerous anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 monoclonal antibodies, some of which have been known to interfere with the  $\alpha$ V $\beta$ 3-based functions of cells. To our surprise, some of the function-blocking mAbs bound to the thigh domain of the  $\alpha$ V chain, which does not contain a ligand-binding site. Further investigation using cells expressing human-to-mouse  $\alpha$ V chimeras revealed that three mAbs shared an amino acid residue located above the  $\alpha$ -genu as a common epitope. These mAbs inhibited fibrinogen binding to  $\alpha$ V $\beta$ 3-expressing cells to varying extents. To elucidate the blocking mechanism of these mAbs,  $\alpha$ V $\beta$ 3 constrained in the extended conformation was engineered. This mutant  $\alpha$ V $\beta$ 3 was highly active, compared with the wild-type, and bound fibrinogen even in the presence of  $Ca^{2+}$ , which is known to inhibit  $\alpha$ V $\beta$ 3-ligand interactions. All the genu-binding mAbs failed to inhibit fibrinogen binding to the mutant  $\alpha$ V $\beta$ 3, suggesting that these mAbs block ligand binding allosterically by restricting the angle of the bend. Our findings are consistent with the hypothesis that the ligand-binding activity of integrin can be regulated by the switchblade-like movement of the leg structure of integrin centering on the genu.

## Materials and Methods

### Antibodies and Reagents

Normal mouse IgG was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The mAbs against  $\alpha$ V (CD51),  $\beta$ 3 (CD61), or  $\alpha$ V $\beta$ 3

complex (CD51/CD61) were obtained from the following sources. Non-functional anti- $\beta$ 3 mAb VNR5-2 has been previously characterized [18]. Anti- $\beta$ 3 mAb SZ21 and anti- $\alpha$ V mAbs AMF-7 [19] and 69-6-5 [20] were purchased from Beckman Coulter (Fullerton, CA). Anti- $\alpha$ V mAbs 17E6 [21] and P2W7 [22] were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA) and R&D Systems (Minneapolis, MN), respectively. Anti- $\alpha$ V mAbs P3G8 [23], M9 [24], and anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 complex-specific mAbs LM609 [25] were purchased from Chemicon International (Temecula, CA). Anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 complex-specific mAb 23C6 [26] were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA). Hybridomas producing anti- $\beta$ 3 mAb 7E3 [27] and anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 complex mAb 10C4.1.3 [28] were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). RPE-conjugated goat anti-mouse polyclonal antibody was purchased from Biosource (Camarillo, CA). The synthetic peptide Gly-Arg-Gly-Asp-Ser (GRGDS) was purchased from the Peptide Research Institute (Osaka, Japan). Fluorescein-isothiocyanate (FITC) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Human fibrinogen was purchased from Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN).

### Construction of Mutant $\alpha$ V cDNA Clones

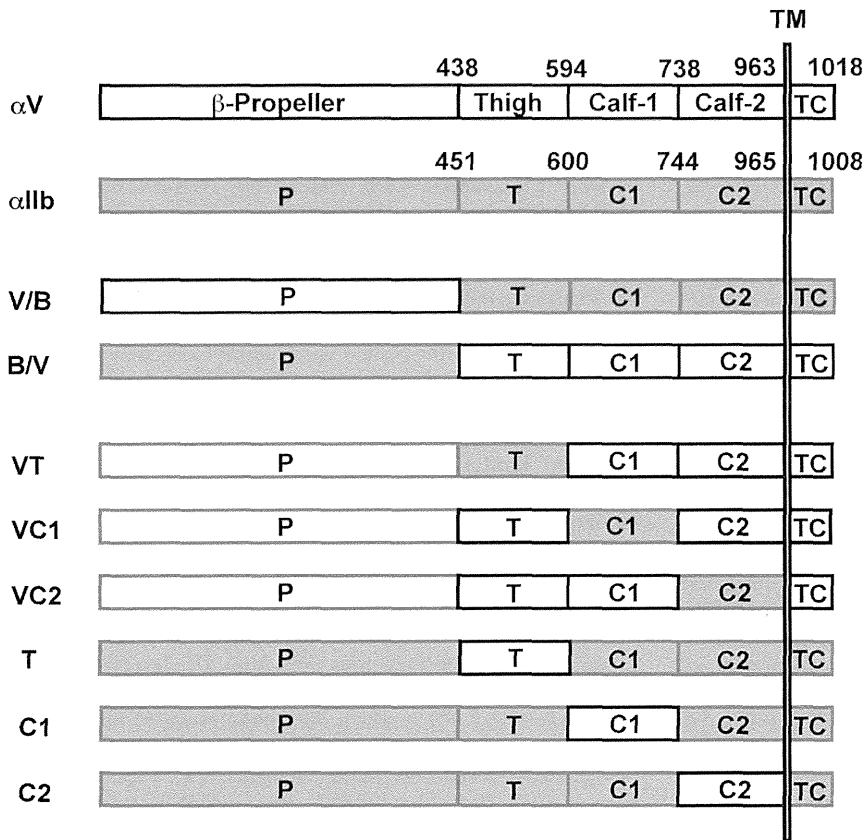
The full-length cDNAs for the integrin  $\alpha$ V,  $\alpha$ IIB and  $\beta$ 3 subunits, which were generous gifts from Dr. Joseph C. Loftus (Mayo Clinic Scottsdale, AZ), were cloned into the mammalian expression vector pBJ-1, which was kindly provided by Dr. Mark Davis (University of California, San Francisco). The cDNAs for the  $\alpha$ V/ $\alpha$ IIB domain-swapping chimeras VT, VC1, and VC2 were created using the overlap extension PCR method. The cDNAs for the B/V, V/B, T, C1, and C2 chimeras have been described elsewhere [29]. The domain boundaries for each chimera were set as shown in Fig. 1. The cDNAs for the human-to-mouse  $\alpha$ V mutants I441V, T460ICP (T460I/S462P), T460I, S462P, V486T, N492H, E496DV (E496D/L497V), Y515HN (Y515H/S516N), S520V, N524T, I527VF (I527V/S528F), I527V, S528F, L532Q, I539V, Y565Q, T571A, and I586V and the cDNA for  $\alpha$ V-to- $\alpha$ IIB mutants Q456P, D457A, N458V, T460S, G465Q, A467K, L468T, and K469P and the cDNA for  $\alpha$ V mutant Q589NAT (Q589N/H591T) were created using site-directed mutagenesis and a Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (BD Biosciences, San Jose, CA).

### Cell Culture and Transfection

Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells, obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA), were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT), 1% penicillin and streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 1% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and maintained at 37°C in a humidified incubator supplemented with 5% CO<sub>2</sub>. Fifty micrograms of  $\alpha$ V or  $\alpha$ IIB cDNA construct was co-transfected with 50  $\mu$ g of  $\beta$ 3 cDNA construct into CHO-K1 cells using electroporation. After 48 hours, the cells were detached and used in further experiments.

### Flow Cytometry

Cells were detached with phosphate-buffered saline (PBS) containing 3.5 mM EDTA. After washing, the cells were incubated with 10  $\mu$ g/mL of mAb in modified HEPES-Tyrode buffer (HTB; 5 mM HEPES, 5 mM glucose, 0.2 mg/mL bovine serum albumin, 1 $\times$  Tyrode's solution) supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MgCl<sub>2</sub> for 30 min at 4°C. After washing, the cells were incubated with an RPE-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG for 30 min at 4°C. After washing, the cells



**Figure 1. Schematic representation of  $\alpha$ V/ $\alpha$ IIb chimeras.** The abbreviations P, T, C1, C2, and TC in the figure stand for  $\beta$ -propeller, thigh, calf-1, calf-2, and transmembrane-cytoplasmic domain, respectively. The numbers indicate the domain boundaries used to create the chimeras. doi:10.1371/journal.pone.0066096.g001

were resuspended in HEPES-buffered saline (HBS; 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$  and 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; the fluorescence was then measured using a FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA).

### Fibrinogen Binding Assay

FITC labeling of human fibrinogen was performed as previously described [30]. Forty-eight hours after transfection, the cells were detached and washed once with HTB. The  $\alpha$ V $\beta$ 3-transfected cells were incubated with anti- $\beta$ 3 mAb VNR5-2 followed by incubation with an RPE-conjugated  $\text{F}(\text{ab}')_2$  fragment of goat anti-mouse IgG. After washing, the cells were incubated with 340  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of FITC-labeled fibrinogen with or without 1 mM GRGDS peptide in HTB containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$  and 1 mM  $\text{MgCl}_2$  or containing 2 mM  $\text{MgCl}_2$  and 5  $\mu\text{M}$  EGTA for 2 hours at 4°C. After washing, fluorescence was measured using a FACSCalibur. The mean Fbg binding (FL1) to cell populations expressing a high  $\beta$ 3 (FL2>1000) was calculated. Background binding in the presence of 1 mM GRGDS peptide was subtracted to obtain the specific binding. In the monoclonal antibody inhibition assays, after staining with primary and secondary antibodies, the cells were resuspended in HTB. Then an equivalent volume of 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mAb solution in PBS was added to yield a final concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As a control, an equivalent volume of PBS was added instead of the mAb solution. Then FITC-labeled fibrinogen,  $\text{MgCl}_2$ , and EGTA were added at concentrations of 340  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2 mM, and 5  $\mu\text{M}$ , respectively. The specific fibrinogen binding was normalized using the expression of  $\alpha$ V $\beta$ 3 on the cell

surface and by dividing the MFI (FL1) obtained in the presence of each mAb by the MFI (FL2) of the gated cell population.

### Immunoprecipitation

Biotin labeling of the cell surface protein was performed using Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Scientific, Rockford, IL), following the manufacturer's instructions. Cells were lysed in 1 mL of lysis buffer (100 mM n-octylglucopyranoside, 20 mM N-ethyl maleimide, 1 mM PMSF, 25 mM Tris-HCl, and 150 mM NaCl, pH 7.4). After removing the insoluble material by centrifugation, the supernatant was used for further analysis. Two hundred microliters of cell lysate was precleared by adding 1  $\mu\text{g}$  of mouse IgG, together with 20  $\mu\text{L}$  of Protein G agarose beads. After centrifugation, the supernatant was recovered and further incubated with 1  $\mu\text{g}$  of VNR5-2, together with 20  $\mu\text{L}$  of Protein G agarose beads overnight at 4°C. Then the supernatant was discarded, and the remaining Protein G agarose beads were washed 3 $\times$  with washing buffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.01% TritonX-100 [pH 8.0]). After washing, the samples were subjected to 7.5% SDS-PAGE, transferred to a polyvinylidene difluoride membrane, probed with horseradish peroxidase-conjugated avidin, and detected using chemiluminescence with the West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL).



**Table 1.** MAb binding to cells expressing tail-swapping chimeras.

	mlgG	10C4	23C6	LM609	17E6	69-6-5	AMF-7	M9	P2W7	P3G8	SZ21
CHO	5.26	4.77	4.34	4.48	4.94	5.23	3.57	3.15	18.99	4.25	3.63
$\beta$ 3	2.72	55.83	70.09	61.93	3.64	4.66	2.92	3.93	4.08	5.84	49.89
$\alpha$ V $\beta$ 3	3.47	61.09	77.73	68.92	67.32	64.4	64.17	71.05	57.59	63.15	54.52
$\alpha$ IIb $\beta$ 3	3.92	57.69	58.25	65.47	3.66	4.25	3.07	4.08	4.61	5.56	51.73
V/B	4.18	58.73	69.11	61.9	53.13	45.19	3.08	3.78	6.00	6.36	52.16
B/V	4.24	51.6	63.63	57.3	7.11	6.44	58.39	63.47	49.97	55.63	49.16

MAb binding to cells expressing wild-type human  $\beta$ 3 ( $\beta$ 3), wild-type human  $\alpha$ V $\beta$ 3 ( $\alpha$ V $\beta$ 3), wild-type human  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3), tail-swapping mutants (V/B, B/V), and to parent CHO cells (CHO) was examined. The numbers represent the percentage of the cell population stained with each mAb.

doi:10.1371/journal.pone.0066096.t001

## Results

### Epitope for functional anti- $\alpha$ V mAb is localized close to the $\alpha$ -genus

To probe the regulatory mechanism of integrin activation, epitopes for numerous anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 mAbs were examined. For this purpose, we generated a series of  $\alpha$ V/ $\alpha$ IIb chimeras. The B/V, V/B, T, C1, and C2 chimeras have been previously described [29]. Additionally, we created the VT, VC1, and VC2 chimeras in the present study (Fig. 1). These chimeric  $\alpha$  chains were expressed together with the wild-type  $\beta$ 3 chain in CHO cells, and the binding of a panel of mAbs to these cells was examined using FACS. All nine anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 mAbs that were tested bound to cells expressing wild-type  $\alpha$ V $\beta$ 3 but not to cells expressing  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 or to parent CHO cells, with the exception of 10C4, 23C6, and LM609, which showed a partial reactivity with cells expressing  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Table 1). However, the MFI values obtained for these 3 mAbs with  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-expressing cells were significantly lower than the MFI values obtained with  $\alpha$ V $\beta$ 3-expressing cells (data not shown). In addition, these 3 mAbs also bound to cells expressing wild-type  $\beta$ 3 alone. These results suggested that 10C4, 23C6, and LM609 cross-reacted with the hamster  $\alpha$ V/human  $\beta$ 3 hybrid. The other mAbs (AMF-7, M9, P2W7, and P3G8) bound to cells expressing B/V, but not to cells expressing V/B. In contrast, 17E6 and 69-6-5 bound to cells expressing V/B, but not to cells expressing B/V (Table 1). These results clearly indicated that the epitopes for mAbs 17E6 and 69-6-5 are contained in the N-terminal  $\beta$ -propeller domain and that the epitopes for mAbs AMF-7, M9, P2W7, and P3G8 are contained in the C-terminal leg region, consisting of the thigh, calf-1, and calf-2 domains. On the other hand, the mAbs 10C4, 23C6, and LM609 bound to cells expressing B/V as well as those expressing V/B. The MFI obtained with B/V was equivalent to the value obtained with cells expressing  $\beta$ 3 alone and was significantly lower than that obtained with V/B (data not shown). These results suggested that the epitopes for 10C4, 23C6, and LM609 are localized in the  $\beta$ -propeller domain, but not the leg region.

Understandably, all the head-binding mAbs block ligand binding. However, some of the leg-binding mAbs also reportedly block cell adhesion, despite the fact that they bind to sites distant from the ligand-binding domain. To explore the mechanism by which these mAbs affect the  $\alpha$ V $\beta$ 3-ligand interaction, we decided to further localize the epitopes for these mAbs. To determine which domains these four leg-binding mAbs bind, individual domain sequences were exchanged between the  $\alpha$ V and the  $\alpha$ IIb chains. The resulting domain-swapping chimeras (T, C1, C2, VT, VC1, and VC2) were expressed together with wild-type  $\beta$ 3 in CHO cells. The reactivity of these mAbs with  $\alpha$ V $\beta$ 3 was lost only

when the  $\alpha$ V thigh domain sequences were replaced with the corresponding  $\alpha$ IIb sequences (VT). In contrast, these mAbs gained reactivity with  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 when the  $\alpha$ IIb thigh domain sequences were replaced by the corresponding  $\alpha$ V sequences (T) (Table 2). These results clearly indicated that the epitopes for the leg-binding mAbs are entirely confined in the thigh domain of the  $\alpha$ V chain, and not in the calf-1 or calf-2 domains.

To further localize the epitopes for these leg-binding mAbs, short stretches of amino acid sequences in the thigh domain of human  $\alpha$ V were replaced with the corresponding mouse  $\alpha$ V sequences. The amino acid sequences of the mouse  $\alpha$ V thigh domain differ from those of the human  $\alpha$ V at 18 positions (Fig. 2). We initially created 14 human-to-mouse  $\alpha$ V mutants and expressed them with wild-type  $\beta$ 3 in CHO cells. As shown in Table 3, AMF-7, M9, and P2W7 failed to bind to cells expressing the T460ICP mutant, whereas P3G8 did not bind to cells expressing the I527VF mutant. None of the other mutations had a significant impact on the binding of these mAbs. The amino acid residues in the 460–462 and 527–528 regions were individually mutated to the corresponding mouse residues to identify the individual amino acid residues that were essential for the binding of these mAbs. As a result, S462P significantly blocked the binding of AMF-7, M9, and P2W7; S528F significantly blocked the binding of P3G8.

Sharing a common epitope does not necessarily imply that AMF-7, M9, and P2W7 bind to exactly the same site. The binding interfaces of AMF-7, M9, and P2W7 were further investigated using  $\alpha$ V/ $\alpha$ IIb chimeras. Although Ser-462 is located in a

**Table 2.** MAb binding to cells expressing domain-swapping chimeras.

	mlgG	AMF-7	M9	P2W7	P3G8	17E6	SZ21
CHO	7.83	5.86	5.72	15.51	5.78	5.91	4.8
$\alpha$ V $\beta$ 3	5.6	68.11	78.41	63.75	67.97	76.32	59.23
VT	4.72	3.37	4.09	6.91	6.44	74.37	68.6
VC1	10.88	82.45	90.34	71.17	76.44	90.39	83.9
VC2	4.7	64.82	81.14	69.67	69.52	78.53	74.97
T	6.4	49.93	62.12	45.45	44.62	4.45	62.75
C1	5.87	3.8	4.03	5.82	6.37	4.05	61.79
C2	5.36	5.53	5.16	6.57	8.25	6.8	71.52

The numbers represent the percentage of the cell population stained with each mAb.

doi:10.1371/journal.pone.0066096.t002

```

human  $\alpha$ V 441  ITVNAGLEVYPSILNQDNKTCSLPGTALKVSCFNVRFCCLKADGKGVLPKLNQVVELLLD 500
mouse  $\alpha$ V 441  V.....I.P.....T.....H...DV... 500
human  $\alpha$ Ib 454  VKASVQ.L.QD.-.PAV.S.V..Q.KTP.....IQM.VG.T.HNI-.Q..SLNA..Q.. 511

human  $\alpha$ V 501  KLKQKGAIRRALFLYSRSPSHSKNMTISRGGMLQCEELIAYLRDESEFRDKLTPITIFME 560
mouse  $\alpha$ V 501  .....HN...V...T..VF...Q.....V..... 560
human  $\alpha$ Ib 512  RQ.PRQG-.V.L.G.QQAGTTL.LDLGGKHSPI.HTTM.F...AD....S..VLSLN 571

human  $\alpha$ V 561  YRLDYRTAADTTGLQPILNQFTPANISRQAHIL 593
mouse  $\alpha$ V 561  ....Q....A.....V..... 593
human  $\alpha$ Ib 571  VS.PPTE.----.MA.AVV LHGDTHVQE.TR.V 599
    
```

**Figure 2. Comparison of amino acid sequences comprising the thigh domains.** We show the amino acid residues 441 to 593 of the human and the murine  $\alpha$ V chain compared with the homologous residues 454 to 599 of the human  $\alpha$ Ib chain that differ from the human  $\alpha$ V residues. The line connecting two Cys residues represents a disulfide link. doi:10.1371/journal.pone.0066096.g002

disulfide-bonded loop, any involvement of other residues in the binding of these mAbs was impossible to determine using human-to-mouse chimeras. For this reason, amino acid residues 456–469 were mutated to the homologous residues in  $\alpha$ Ib (Fig. 2) and expressed together with wild-type  $\beta$ 3 in CHO cells. As shown in Fig. 3, these  $\alpha$ V-to- $\alpha$ Ib mutations affected mAb binding differently. The binding of AMF-7, M9 and P2W7 were all impaired by G465Q and A467K. In addition, K469P significantly attenuated P2W7 binding. In the crystal structure, the disulfide-

bonded loop including Ser-462 is located above the  $\alpha$ -genu (Fig. 4). Although Asp-457, Ala-467, and Lys-469 were separated in the primary structure, they were all located close to Ser-462 in the tertiary structure. On the other hand, Ser-528 was located on the side of the thigh domain distal to the  $\alpha$ -genu (Fig. 4).

**MABs that bind to the  $\alpha$ -genu affected ligand binding differently**

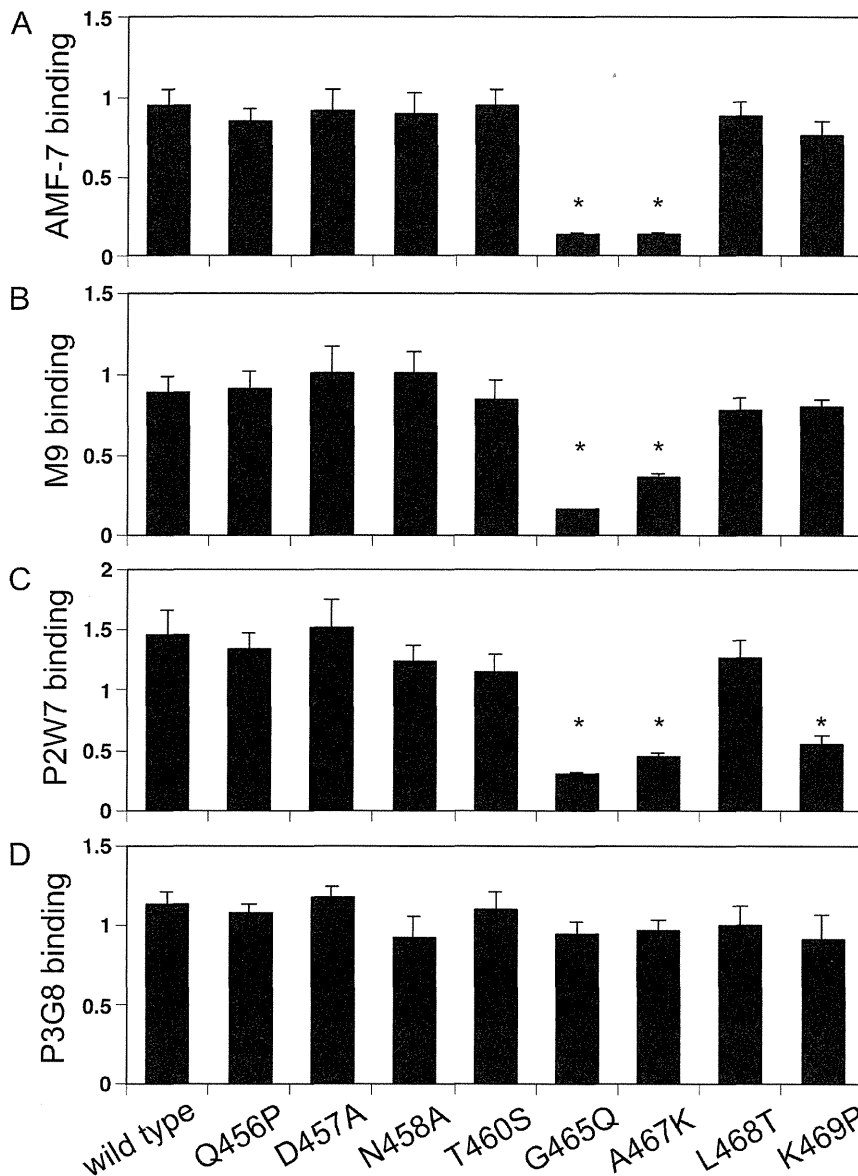
To confirm the effect of these leg-binding mAbs on  $\alpha$ V $\beta$ 3-ligand interactions, fibrinogen binding to  $\alpha$ V $\beta$ 3-transfected cells was examined in their presence. FITC-labeled fibrinogen was incubated with  $\alpha$ V $\beta$ 3-expressing cells, and bound fibrinogen was measured using FACS. However, cells expressing the wild-type  $\alpha$ V $\beta$ 3 did not bind fibrinogen in the presence of 1 mM  $Mg^{2+}$  and 1 mM  $Ca^{2+}$ .  $Ca^{2+}$  is known to block  $\alpha$ V $\beta$ 3-ligand interactions, while  $Mg^{2+}$  supports such interactions. For this reason, 2 mM  $Mg^{2+}$  was utilized together with 5  $\mu$ M EGTA to remove residual  $Ca^{2+}$  from the buffer. Under this cation condition, wild-type  $\alpha$ V $\beta$ 3 exhibited modest fibrinogen binding (Fig. 5A). Next, the effect of the anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 mAbs was examined using the same cation condition. The function-blocking anti- $\beta$ 3 mAb 7E3, which binds to the ligand-binding  $\beta$ A domain, significantly inhibited fibrinogen binding to cells expressing wild-type  $\alpha$ V $\beta$ 3. In contrast, anti- $\alpha$ V mAb P3G8 did not affect the binding. All three mAbs that bind above the  $\alpha$ -genu blocked binding, albeit not as potently as 7E3 (Fig. 5B). A high-resolution EM study of recombinant  $\alpha$ V $\beta$ 3 revealed that the leg of the  $\alpha$ V undergoes a bending/extending movement at the genu. These results suggest the possibility that the three mAbs might regulate the activity of  $\alpha$ V $\beta$ 3 by stabilizing the angle of the bend in favor of the bent conformation. To examine whether this situation actually occurs, fibrinogen binding was examined on cells expressing  $\alpha$ V $\beta$ 3 constrained in the extended conformation. To constrain  $\alpha$ V $\beta$ 3 in the extended state, an N-glycosylation site consisting of an N-X-T/S motif was introduced at amino acid residue Gln-589 of  $\alpha$ V, which is located at the back of the genu (Fig. 4). The resulting Q589NAT mutation was thus expected to prevent  $\alpha$ V $\beta$ 3 from adopting a bent conformation. An SDS-PAGE analysis of the  $\alpha$ V $\beta$ 3 that immunoprecipitated with the anti- $\alpha$ V mAb revealed that the  $\alpha$ V chain with the Q589NAT mutation migrated slightly more slowly than the wild-type  $\alpha$ V, indicating the attachment of an extra glycan to the mutant (Fig. 6A). The homologous Q595NTT mutation in  $\alpha$ Ib has been shown to constitutively activate  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 [7].

**Table 3. MAb binding to cells expressing human-to-mouse  $\alpha$ V mutants.**

	mIgG	AMF-7	M9	P2W7	P3G8	17E6	SZ21
CHO	3.62	2.56	2.95	13.3	3.2	4.07	1.16
WT	6.8	74.11	85.85	78.21	83.47	87.07	71.41
I441V	4.15	76.76	70.66	72.64	77.61	79.97	70.78
T460ICP	5.15	5.84	3.26	7.01	70.72	77.52	65.15
T460I	5.88	62.11	63.27	54.8	56.43	70.81	64.01
S462P	5.52	14.66	3.75	17.17	66.41	76.18	66.88
V486T	11.93	72.65	78.35	71.75	64.14	82.23	71.1
N492H	10.04	70.78	79	70.14	72.01	82.49	73.56
E496DV	14.9	73.25	76.95	67.31	75.08	75.01	58.72
Y515HN	8.47	59.79	67.31	59.04	65.69	66.81	50.75
S520V	8.33	65.13	72.76	61.29	73.55	71.38	60.68
N524T	12.98	60.75	69.31	58.6	65.03	66.37	57.98
I527VF	9.55	74.93	78.94	59.25	9.26	84.31	81.13
I527V	3.12	75.57	78.3	64.88	77.78	83.6	67.47
S528F	5.32	80.94	82.19	76.5	10.59	85.83	78.1
L532Q	26.68	62.2	77.22	58.2	62.38	76.84	71.26
I539V	13.13	73.98	67.01	57.12	68.84	76.24	64.92
Y565Q	11.64	70.1	77.22	64.52	71.32	80.13	72.63
T571A	27.84	68.76	69.91	54.89	59.55	75.22	75.28
I586V	9.99	70.96	78.21	61.16	70.96	68.54	76.34

The numbers represent the percentage of the cell population stained with each mAb. Bindings significantly lower than those for 17E6 or SZ21 are marked in red.

doi:10.1371/journal.pone.0066096.t003

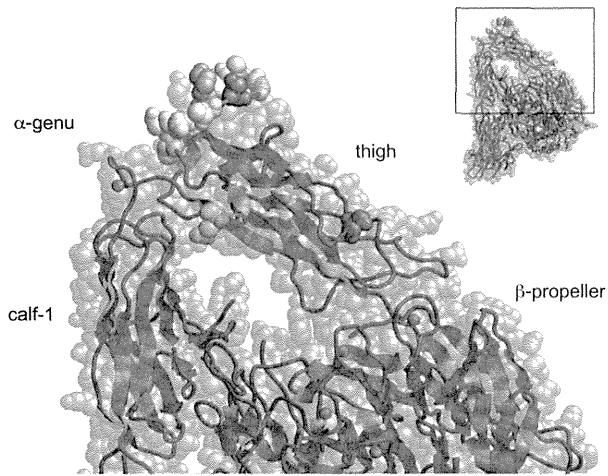


**Figure 3. Effect of  $\alpha$ V-to- $\alpha$ Ib mutation on the binding of the leg-binding mAbs.** The amino acid residues 457–467 of the  $\alpha$ V chain were individually mutated to the corresponding  $\alpha$ Ib residues. The mutant  $\alpha$ V was transiently expressed together with wild-type  $\beta$ 3 in CHO cells, and the binding of mAbs to these cells was examined by FACS. The ratio of the MFI obtained from the whole cell population with each mAb to that obtained with 7E3 is shown as normalized binding. Asterisks indicate binding that was less than 50% of the wild type. doi:10.1371/journal.pone.0066096.g003

Likewise, cells expressing the Q589NAT mutation exhibited robust fibrinogen binding, compared with cells expressing wild-type  $\alpha$ V $\beta$ 3 (Fig. 6B). Finally, the effect of anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 mAbs on fibrinogen binding to Q589NAT was examined using the same cation condition. As in the wild type, anti- $\beta$ 3 mAb 7E3 significantly blocked binding. In contrast, the mAbs AMF-7, M9, and P2W7 all failed to inhibit binding, as did P3G8 (Fig. 6C). It appeared possible that the Q589NAT mutation might directly affect the binding of these mAbs. To exclude this possibility, the reactivity of these mAbs was compared between cells expressing wild-type  $\alpha$ V $\beta$ 3 and cells expressing Q589NAT mutation. The result confirms that the Q589NAT mutation did not have any effect on the binding of AMF-7, M9, P2W7, or P3G8, as the binding of 7E3 (Fig. 7).

## Discussion

We previously reported that extended  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 had a high affinity for fibrinogen, whereas bent  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 had a low affinity [7]. This previous study was based on a comparison of genetically engineered  $\alpha$ Ib $\beta$ 3, in which the three-dimensional structure was constrained either in the extended or bent conformation. However, these artificially engineered conformers do not necessarily represent native conformations that wild-type proteins adopt during physiological activation. For this reason, we used another approach to investigate the role of integrin extension in affinity regulation. In the present study, we showed that 1) the epitope for a group of anti- $\alpha$ V mAbs is located above the  $\alpha$ -genu at which the leg of the integrin molecule bends, 2) these mAbs had a partial blocking effect on the  $\alpha$ V $\beta$ 3-ligand interaction, 3) constraining

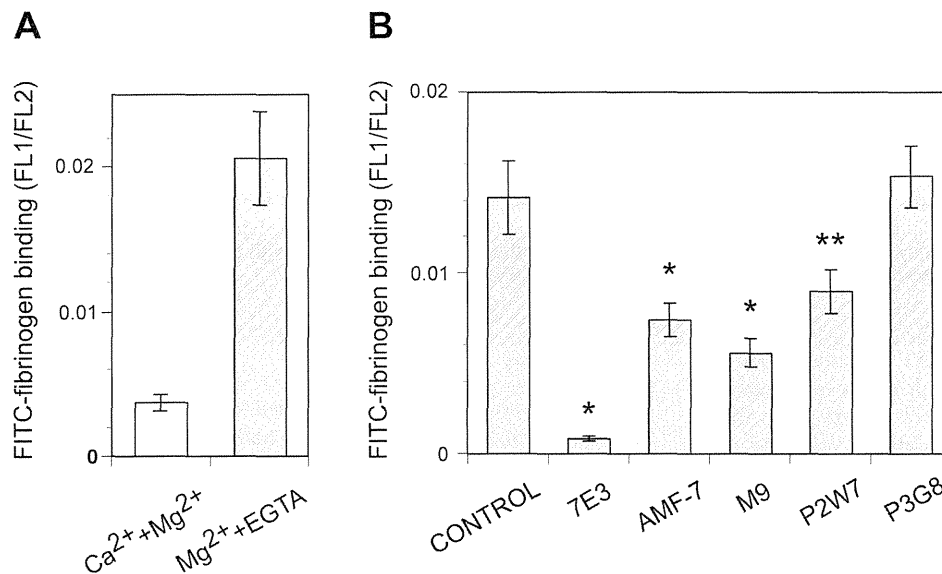


**Figure 4. Locations of the critical residues for mAb binding in the three-dimensional  $\alpha$ V $\beta$ 3 structure.** The crystal structure of the  $\alpha$ V chain is shown by the blue spacefill representation, with its backbone shown by the ribbon. The  $\beta$ 3 chain is shown by the gray ribbon. The epitope residues Ser-462 and Ser-528 are highlighted in red and magenta, respectively. Gly-465 and Ala-467 — which create a binding interface for AMF-7, M9, and P2W7 — are highlighted in yellow. Lys-469, important for P2W7 binding, is highlighted in orange. Residues that did not affect mAb binding when mutated are highlighted in white (see text). Gln-589 is highlighted in cyan. Note that Ser-462 is located above the  $\alpha$ -genu, while Ser-528 is located on the side of the thigh domain distal to the  $\alpha$ -genu.  
doi:10.1371/journal.pone.0066096.g004

$\alpha$ V $\beta$ 3 in its extended conformation resulted in robust activation, and 4) genu-binding inhibitory mAbs failed to block ligand binding to the extended  $\alpha$ V $\beta$ 3 molecule. Our results are consistent with the switchblade hypothesis (in which integrin extension increases the

affinity for ligands), rather than the dead-bolt theory (in which integrin activation is restrained by the  $\beta$ A/ $\beta$ T interaction, the disruption of which activates integrin without causing substantial extension).

Among the nine anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 mAbs that we tested, five of them — 10C4, 23C6, LM609, 17E6, and 69-6-5 — bound to the  $\beta$ -propeller domain, which composes a ligand-binding site with the  $\beta$ A domain. Consistently, these mAbs reportedly block the function of  $\alpha$ V $\beta$ 3 integrin [20,21,25,28]. On the other hand, among the four mAbs that bound to the thigh domain, AMF-7 reportedly inhibits cell adhesion [19] and M9 inhibits cell migration [24]. In contrast, P3G8 does not inhibit cell attachment to adhesive ligands [23], and no functional role has been reported for P2W7. We found these results surprising, since the thigh domain is located at a distance from the ligand-binding site. A fibrinogen binding study confirmed that AMF-7, M9, and P2W7 have a blocking effect on ligand binding, while P3G8 does not have any such effect (Fig. 5B). The effects of these mAbs were statistically significant. Notably, the function-blocking mAbs recognized the amino acid residue Ser-462, which is located within the disulfide-bonded loop above the  $\alpha$ -genu, as a common epitope (Fig. 4). How can these genu-binding mAbs block ligand binding even though they bind at a site distant from the ligand-binding site? The genu-binding mAbs might block fibrinogen binding directly, depending on the orientation of the bound mAb. However, experiments using  $\alpha$ V/ $\alpha$ IIb domain-swapping chimeras suggest that the epitopes for the genu-binding mAbs are contained entirely within the thigh domain. These results indicate that the orientation of the bound mAbs relative to the bound ligand or the ligand-binding sites remains the same, regardless of the bent/extended states. If true, the genu-binding mAbs would likely block the extended  $\alpha$ V $\beta$ 3 as well. However, the results of our mAb blocking study on Q589NAT mutation suggest otherwise (Fig. 6C). These results seemed to indicate that the mAbs affected ligand binding via an allosteric mechanism, presumably by restricting the



**Figure 5. Effect of anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 mAbs on fibrinogen binding.** A. FITC-fibrinogen binding to cells expressing  $\alpha$ V $\beta$ 3 in the presence of 1 mM Ca<sup>2+</sup> and 1 mM Mg<sup>2+</sup> (open column) or in the presence of 2 mM Mg<sup>2+</sup> and 5  $\mu$ M EGTA (hatched column) is shown. The ratio of the MFI (FL1) to the MFI (FL2) in the gated cell population was used to normalize the binding with the expression of  $\alpha$ V $\beta$ 3 on the cell surface. B. FITC-fibrinogen binding to cells expressing wild-type  $\alpha$ V $\beta$ 3 in the presence of 2 mM Mg<sup>2+</sup> and 5  $\mu$ M EGTA was examined. Binding in the presence of 100  $\mu$ g/mL of the indicated mAb is shown in the hatched column. An equivalent volume of PBS, instead of the mAb solution, was included to obtain the control binding. The asterisks indicate statistically different binding abilities, compared with the control (\* $P$ <0.01, \*\* $P$ <0.05).  
doi:10.1371/journal.pone.0066096.g005